

ACLIMATACIÓN, CULTIVO EN VIVERO Y CALIDAD DE PLANTA DE CASTAÑO MICROPROPAGADO

M.E. Miranda Fontañña

J. Fernández López

Centro de Investigaciones Forestales de
Lourizán. Xunta de Galicia. Apartado 127.
36080, Pontevedra (España).

RESUMEN

Se describen las condiciones e instalaciones necesarias para aclimatar plantas de castaño procedentes de cultivo *in vitro*. Así mismo se analiza el estado hídrico del material vegetal que se encuentra en diferentes etapas del proceso de micropropagación, observándose altos niveles de transpiración tanto en brotes crecidos *in vitro*, como el material en aclimatación.

Por otro lado, se estudia la calidad de la planta castaño producida por micropropagación, comparándola con el material procedente de acodo bajo y de semilla.

Palabras clave: Micropropagación, *Castanea crenata* y *C. sativa*, Aclimatación, Calidad de planta, Relaciones Hídricas.

SUMMARY

ACCLIMATIZATION, CULTIVATION IN NURSERY AND PLANT QUALITY ON MICROPROPAGATED CHESTNUT PLANTS

In this paper the conditions and installations to acclimatize chestnut plants from tissue culture are described. Water relations of the vegetable material from different stages of micropropagation process are also analysed. High levels of transpiration both *in vitro* grown shoots and plants on acclimatization step are recorded.

Plant quality from micropropagation is studied and compared with plant from stooling and seedling.

Key words: Micropropagation, *Castanea crenata* and *C. sativa*, Acclimatization, Plant Quality, Water Relations.

Introducción

La micropropagación permite la rápida multiplicación clonal de híbridos interespecíficos de *Castanea crenata* y *C. sativa*, seleccionados para producción de madera o

como portainjertos (MIRANDA y FERNÁNDEZ, 1993). El éxito de esta técnica, a escala comercial depende de que se consigan, además de unas tasas de multiplicación adecuadas, aclimatar el material con elevado porcentaje de supervivencia y que la calidad de la planta obtenida en vivero sea buena.

La aclimatación implica un acondicionamiento gradual de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones *in vivo*. Con el objeto de optimizar las condiciones de aclimatación y minimizar las pérdidas de plantas, se estudia el estado hídrico de las plantas durante la aclimatación y se compara con material vegetal de otras etapas del proceso de micropropagación. Así mismo, se describen las condiciones e instalaciones en las que se desarrolla la aclimatación.

Debido a la importancia que tiene la calidad de las plantas obtenidas, para la aplicación de la técnica a nivel comercial, se analiza la calidad de planta micropropagada, comparándola con la obtenida por acodo bajo (sistema de propagación comercial tradicionalmente utilizado) y semilla.

Materiales y métodos

Material vegetal: El material estudiado son clones de castaño híbridos entre *Castanea crenata* y *C. sativa* (URQUIJO, P. 1956; VIEITEZ, E. 1960), seleccionados para producción de madera o como portainjertos.

Multiplificación in vitro: El material utilizado en este estudio había sido establecido *in vitro*, a partir de brotes recientes de cepa. Este material fue subcultivado cada cuatro semanas, multiplicado, elongado y enraizado directamente en sustrato esterilizado (MIRANDA y FERNÁNDEZ, 1992, 1993) en una cámara de crecimiento con temperatura 25°C, 16 horas de fotoperíodo y luminosidad (radiación PAR) de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$. Posteriormente las plantas fueron trasladadas a un invernadero para su aclimatación.

Aclimatación y Cultivo en Vivero: Las plantas son aclimatadas mediante una reducción progresiva de la humedad relativa

(desde el 100 al 70%), en un túnel de polietileno transparente de 600gg, situado en un invernadero que posee condiciones ambientales controladas, durante todo el año. Los túneles de aclimatación tienen una longitud de 8 metros de largo, 1.2 metros de ancho y 60 cm de alto en su punto central, están provistos de un sistema fog-air que funciona a ocho atmósferas y está controlado con un humidostato, para conseguir la humedad deseada. La temperatura en el interior oscila entre 26° y 21°C y la luminosidad es próxima a 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ al medio día solar. Este sistema permite mantener elevada la humedad alrededor de la planta evitando encharcamientos. El proceso de aclimatación dura de uno a dos meses.

Tras la aclimatación, las plantas son trasplantadas a recipientes individuales de 500 c.c. para el cultivo en invernadero o son establecidas en campo durante la primavera, para su cultivo a raíz desnuda, con un espaciamiento de 20x20 cm, en eras cubiertas con polietileno negro para el control de malas hierbas. Las plantas crecidas en recipiente se trasplantaron al año siguiente a suelo.

Medidas de estado hídrico: Se tomaron datos de la transpiración ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y Resistencia Estomática a la Difusión ($\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) en material vegetal que se encontraba en diferentes etapas del proceso de micropropagación: (1) al final de la elongación (*in vitro*), (2) durante la aclimatación y (3) durante el cultivo en invernadero en recipiente de 500 cc. Con el fin de igualar las condiciones ambientales durante las mediciones, se colocaron los brotes (caso 1) y las plantas (casos 2 y 3) en un túnel con humedad relativa próxima al 75 %, temperatura 25°C y luminosidad (radiación PAR) media de 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$. Así mismo, se tomaron medidas de ambos parámetros en función de la variación de la humedad relativa

(entre 40 y 98 %). Las medidas fueron hechas en la última hoja expandida, entre las doce y trece hora solar (en 15 plantas y al menos dos repeticiones). Para la toma de datos se utilizó un porómetro (Steady State Porometer, Li-1600, Li-Cor. Inc. Nebraska, USA).

Calidad de Planta Micropropagada: Se determinó una vez finalizado el proceso de producción en vivero (al final del primer y del segundo año). Para ello se midieron los siguientes parámetros: (1) longitud de tallo (cm), (2) diámetro de cuello (cm) (3) tipo de ramificación (número de ramas, longitud, grosor), (4) materia seca de parte aérea y radical y (5) años que tarda en producir fruto, además se observaron otros caracteres subjetivos relacionados con la forma de crecimiento.

El *tratamiento estadístico* de los resultados se obtuvo mediante un análisis de varianza realizado con SAS (1987) por el método GLM y la comparación de medias fue hecha por el test Student-Newman-Keuls (SNK) para un nivel de significación de 0.05. Con los datos de variación de trans-

piración en función de la humedad relativa, se realizó un análisis de regresión lineal usando el procedimiento REG para cuantificar las relaciones entre estas variables.

Resultados y Discusión

Aclimatación: En las condiciones descritas se consigue al menos un 90% de supervivencia. El crecimiento inicial de las plántulas en el túnel es muy lento, pero después de cuatro semanas se alcanza un crecimiento vigoroso y un considerable aumento en la longitud de los entrenudos y del tamaño de las nuevas hojas desarrolladas.

Medidas de pérdida de agua transpiracional: Existen diferencias significativas en las tasas medias de transpiración para humedades relativas constantes y altas (70 a 80 %), dependiendo de la etapa en la que se encuentra el material vegetal (Tabla 1). Así los brotes desarrollados *in vitro* presentan niveles de transpiración mucho más elevadas ($6.37 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) que las plantas acli-

TABLA I
VALORES MEDIOS DE TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMÁTICA A LA DIFUSIÓN, EN MATERIAL DE CASTAÑO EN TRES ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN. HR 70-80%, TEMPERATURA 25.4 °C. VALORES SEGUIDOS DE LA MISMA LETRA NO SON SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES A UN NIVEL DE PROBABILIDAD DE 5%.

	Transpiración ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Resistencia Estomática ($\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)
I. <i>In Vitro</i>	6.37 a	0.63 b
II. Aclimatación	3.94 b	1.48 b
III. Invernadero	1.05 c	7.18 a

matadas ($3.93 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) o creciendo en el invernadero ($1.04 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

En la Tabla 2 se vuelve a observar los altos valores de transpiración, en material *in vitro*, sobre todo para humedades ambientales próximas al 40%. Esto indica la importancia de situar el material crecido *in vitro* en condiciones de humedad similar a las que existe en el recipiente de cultivo, donde la atmósfera saturada de humedad supone un pequeño gradiente entre el espacio intercelular de las hojas y el ambiente, causando baja transpiración (valores superiores al 90%). Sin embargo, cuando las plantas micropropagadas son transferidas a condiciones con valores bajos de humedad ambiental, se origina un gradiente de humedad elevado que induce la pérdida de agua excesiva y descontrolada causando rápida deshidratación (BLANKE and BELCHER, 1989). Así mismo, se ha encontrado una relación (coeficiente de determinación) inversa significativa, para brotes crecidos *in vitro* ($R^2 = 0.87$) entre la humedad relativa y la transpiración, mientras que para los otros dos tipos de material no es significativa

(planta aclimatada $R^2 = 0.18$; planta en invernadero $R^2 = 0.45$).

Resistencia Estomática a la Difusión de vapor de agua: En la tabla 1 se observa que, para una humedad relativa entre 70-80%, los brotes crecidos *in vitro* presentan valores medios más bajos ($0.66 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$) que las plantas aclimatadas ($2.71 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$) y ambos significativamente más bajos que en plantas de invernadero ($7.18 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los valores de resistencia de las hojas varía en función de la humedad relativa ambiental (Tabla 2), pero el grado de dependencia es diferente dentro de cada grupo de material vegetal, siendo muy elevado en material desarrollado en invernadero.

Los valores de la resistencia estomática y de la transpiración son indicativos del grado de apertura de los estomas y del funcionamiento de los mismos. Los datos vistos anteriormente indica que los estomas de plantas de castaño crecidas *in vitro* no funcionan correctamente, provocando tasas de transpiración excesivas, dato ya señalado para otras especies por BRAINERD and

TABLA 2:
VALORES EXTREMOS DE TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMÁTICA A LA DIFUSIÓN PARA HUMEDADES RELATIVAS COMPRENDIDAS ENTRE EL 42.4 Y 98.8 %, TEMPERATURA 25.4 °C, EN LOS TRES GRUPOS DIFERENCIADOS DE CASTAÑOS MICROPROPAGADOS

	Transpiración ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)			Resistencia Estomática ($\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$)			Humedad Relativa (%)	
	Medio	Max.	Min.	Medio	Max.	Min.	Min.	Max
I. <i>In Vitro</i>	7.08	12.88	1.83	0.60	0.99	0.06	42.4	98.8
II. Aclimatación	3.82	7.78	1.10	1.84	5.66	0.65	48.0	89.6
III. Invernadero	1.29	2.47	0.48	6.40	11.2	2.07	42.8	86.8

FUCHIGAMI (1982) y SUTTER and LANGHANS (1982).

La supervivencia de plantas que son transferidas de la cámara de cultivo, depende por un lado de la adaptación progresiva de las hojas presentes en este momento, así como del rápido crecimiento de las nuevas hojas que ya están adaptadas a las condiciones del invernadero SUTTER and LANGHANS (1982). Por ello, la transferencia de plantas de castaño, desde la cámara de cultivo al invernadero, debe realizarse cuatro semanas después de haber comenzado el enraizamiento. En este momento, ya existe crecimiento activo en el 90 % de los brotes enraizados y así las nuevas hojas se desarrollarán en condiciones ambientales más adecuadas.

Calidad de Planta: Las plantas procedentes de micropropagación presentan durante el primer año menor tamaño que la obtenidas por acodo (que poseen 1,5 m.), debido al pequeño tamaño inicial, sin embargo, su crecimiento posterior es muy rápido. El material micropropagado posee respectivamente, a los 2,5 y a los 6 meses, una altura media de 6,93 y 23,95 cm. y un diámetro en el cuello de la raíz 0,20 y 0,85 cm. En la tabla 4 se pueden observar los crecimientos en plantas micropropagadas de 1, 2 y 3 años. Después de uno o dos años de crecimiento en vivero, presentan tamaño suficiente para ser usadas en plantaciones forestales.

Del análisis de los datos de materia seca se deduce que las plantas micropropagadas son mucho más equilibradas que las procedentes de acodo bajo, pues el sistema radical supone el 53,31% y 45,68% de la materia seca total en planta de uno y dos años respectivamente, frente al 7,08% en plantas de acodo de un año MIRANDA Y FERNÁNDEZ, 1993). Además las plantas de cultivo *in vitro* poseen un sistema radical bien forma-

do, con un número medio de raíces primarias superior a 12, caracterizándose por ser gruesas, muy largas y ramificadas. Estas características son responsables del éxito de la planta micropropagada durante el trasplante y la supervivencia en campo (superior al 90 %).

En cuanto a la forma de crecimiento, las plantas procedentes de cultivo *in vitro* mantienen una dominancia apical muy marcada. La propagación por acodo ocasiona problemas de plagiotropismo que a veces se subsanan con la edad. En la plantas de castaño micropropagadas, esta forma de crecimiento aparece raramente durante el primer año de desarrollo y desaparece casi completamente durante el segundo período vegetativo, resultados similares con planta micropropagada han sido encontrados por RITCHIE y LONG (1986) trabajando con *Pseudotsuga menziesii*.

La forma de ramificación, en plantas micropropagadas crecidas a raíz desnuda, está caracterizan por producir durante el primer y segundo año ramas laterales más grandes y en mayor número que en las plantas procedentes de acodo bajo. En las plantas de acodo apenas se desarrollan ramas laterales durante el primer año. En las plantas crecidas en envase el número de ramas es menor y, durante el siguiente año de crecimiento en suelo, las ramas son más cortas y delgadas que las desarrolladas desde el principio a raíz desnuda. Mayor similitud en el sistema de ramificación se encuentra cuando se comparan plantas procedente de cultivo *in vitro* y de semilla (Tabla 3), observándose un número medio de ramas muy similar, aunque la forma de ramificación difiere, debido a que en planta micropropagada las ramas son más largas, con ramificación secundaria y se desarrollan sobre todo en la base, mientras que en planta de semilla son más cortas y abundantes hacia

TABLA 3
ABUNDANCIA DE RAMAS Y LONGITUDES Y DIÁMETROS DE LAS MISMAS, EN
CASTAÑOS MICROPROPAGADOS Y PROCEDENTES DE SEMILLA, TRAS DOS
AÑOS DE CRECIMIENTO EN VIVERO. DATOS MEDIOS DE DOS CLONES

	Nº Medio de ramas	Longitud media (cm)	Diámetro medio (cm)
Micropropagada 2º año	10,02 ± 3,49	31,74 ± 20,05	0,43 ± 0,21
Semilla 2º año	15,38 ± 5,80	23,51 ± 57,74	0,44 ± 0,14

TABLA 4
VALORES (V) DE CRECIMIENTO DE PLANTA MICROPROPAGADA AL FINAL
DEL PRIMER Y SEGUNDO AÑO EN VIVERO. LOS DATOS AQUÍ PRESENTES SON
MEDIAS DE 15 CLONES EN LOS DOS PRIMEROS CASOS Y DE 5 CLONES
EN LOS DOS SIGUIENTES. R.D.: RAÍZ DESNUDA, REC.: RECIPIENTE (500 CC).

	Altura (cm)			Diámetro (cm)		
	V. Medio	V.Mínimo	V.Máximo	V.Medio	V.Mínimo	V.Máximo
Rec. 1 año	59,80	39,01	86,56	0,70	0,50	0,96
R.D. 1 año	65,89	26,76	105,29	1,30	0,68	1,97
R.D. 2 años	155,78	86,00	240,00	2,49	1,08	4,1
R.D. 3 años	236,67	110,00	350,00	3,60	1,44	6,35

el ápice. La tendencia del material micropropagado a producir elevado número de ramas laterales ha sido encontrada en rododendron ETTINGER y PREECE, 1985) y en grosella (WAINWRIGHT and FLEGMANN 1985).

La precocidad en la floración y la fructificación varía entre clones, en algunos ocurre durante el segundo año en de crecimiento en campo, mientras que en otros clones se retrasa al tercer y cuarto año.

Conclusiones

Para lograr buenos resultados en la micropropagación de castaño, a nivel comercial, es imprescindible conseguir un alto porcentaje de supervivencia durante la aclimatación. Los resultados sobre el comportamiento hídrico, en material procedente de la cámara de cultivo, indican un anormal funcionamiento de los estomas, lo que pro-



Figura 1: Aspecto general del invernadero de aclimatación de castaños micropropagados.

voca tasas de transpiración excesivas. De ahí la importancia de realizar la transferencia, desde laboratorio al invernadero, en el momento adecuado y de contar con buenas instalaciones de aclimatación, que regulen las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento rápido del nuevo material.

La planta de castaño procedente de cultivo *in vitro* presenta altos porcentajes de supervivencia durante el trasplante y crecimiento en campo. Estos altos porcentajes de supervivencia son debidos a su buena calidad y a que son muy equilibradas, como se deduce de los resultados de materia seca. Debido a su pequeño tamaño inicial es necesario mantenerlas durante uno o dos años en vivero, antes de ser utilizadas en plantaciones y deben ser sometidas a poda, debido al elevado número de ramas laterales que presentan.

Bibliografía

- BRAINERD, K.E. and FUCHIGAMI, L.H., 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO₂. *J. Exp. Bot.* 33:388-392.
- BLANKE, M.M. and BELCHER, A.R. 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19 (1): 85-89.
- ETINGER, T.L. and PREECE, J.E., 1985. Aseptic micropropagation of *Rhododendron* P.J.M. hybrids. *J. Hortic. Sci.* 60: 269-274.
- MIRANDA, E. and FERNÁNDEZ, J., 1992. The micropropagation of Chestnut tree: *in vivo* establishment and post-propagation growth. In: *Mass Production Technology for Genetically improved-fast Growing Forest Tree Species I*: 421-426. AFOCEL-IUFRO. Bordeaux, France.
- MIRANDA, M.E.; FERNÁNDEZ, J., 1993. Micropropagación, Cultivo en vivero y calidad de planta de clones híbridos de *Castanea sativa* y *Castanea*

- crenata*. I Congreso Forestal Español. Pontevedra, Junio de 1993. pp. 343-348.
- RICHIE, G.A. and LONG, A.J., 1986. Field performance of micropropagated Douglas Fir. *New Zealand Journal of Forestry Science* 16 (3): 343-356.
- SAS (1987). SAS/STAT guide for personal computers, SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- SUTTER, E. and LANGHANS, R.W., 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage regenerated from shoot-tip culture. *Canadian Journal of Botany*, 60: 2896-2902.
- URQUIJO, P., 1957. La regeneración de castaño, Bol. Pat. Veg. Ent. Agr. XXII, 217-232.
- VIEITEZ, E., 1960. Obtención de castaños resistentes a la enfermedad de la tinta. Centro Regional de Enseñanzas y experiencias Forestales de Lourizán, Pontevedra.
- WAINWRINGHT, H. and FLEGMANN, A.W., 1985. The micropropagation of gooseberry (*Ribes uvacrispa* L.): II. In vitro proliferation and in vivo establishment. *J. Hortic. Sci.* 60 (4): 481-491.

(Aceptado para publicación el 11 de mayo de 1995)